

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 **Offenlegungsschritt**
11 **DE 38 10 803 A 1**

51 Int. Cl. 4:
A61 L 27/00
C-12 N 5/00

21 Aktenzeichen: P 38 10 803.8
22 Anmeldetag: 30. 3. 88
43 Offenlegungstag: 12. 10. 89

Behördeneigentum

DE 38 10 803 A 1

BEST AVAILABLE COPY

71 Anmelder:
Battelle-Institut eV, 6000 Frankfurt, DE

72 Erfinder:
Heide, Helmut, Dr., 6233 Kelkheim, DE; Jones,
David, Dr., 4400 Münster, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

64 Verfahren zur Herstellung eines synthetischen Knochenmaterials mit körpereigenen Eigenschaften

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines synthetischen Knochenmaterials mit körpereigenen Eigenschaften.

Hierbei werden menschliche Knochenzellen (Präosteoblasten und Osteoblasten) extrakorporal auf dem knochenähnlichen Material ähnlich calciumphosphatischen Werkstoffen, Substratmaterialien in Form von Biopolymeren oder Mischungen aus beiden gezüchtet.

DE 38 10 803 A 1



Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung lebender Knochenersatzmaterialien durch extrakorporale Züchtung autogener Knochenzellen auf Calciumphosphatmaterial und/oder organischen Substanzen, wobei ein "Verbundmaterial" entsteht, welches dem Patienten reimplantiert werden kann, von dem zuvor entsprechende Knochenzellen entnommen wurden.

In der orthopädischen Chirurgie besteht ein dringender Bedarf an Knochenersatz, mit dem auch größere Defekte überbrückt und geheilt werden können. Solcher Knochenersatz findet Einsatz z. B. bei folgenden Indikationen:

- In der Traumatologie bei ausgedehnten Trümmerbrüchen und großen Defekten;
- bei onkologischen Operationen zur endgültigen Stabilisierung und Ausfüllung des Defektes;
- bei schweren Wirbelsäulendeformitäten werden in großem Umfang Knochen transplantiert;
- beim künstlichen Gelenkersatz;
- in der Kieferchirurgie u. a.

Da autologer Knochen (d. h. Knochen desselben Patienten) nur im begrenzten Maße zur Verfügung steht, wurden bisher homologe Knochen aus der Knochenbank eingesetzt. Bei ständig steigendem Bedarf wird das Angebot an immunologisch geeignetem Material jedoch zunehmend geringer. Deshalb ist z. B. schon versucht worden, keramische Werkstoffe auf der Basis von Calciumphosphaten, denen eine gewisse osteo-induktive Wirkung zugeschrieben wird, in die betreffenden defekten Stellen des Körpers einzusetzen. Derartige Möglichkeiten konnten aber die Aufgabe zur Therapie größerer Knochendefekte nicht erfüllen, weil nur kleinere Defekte überbrückt werden könnten. Die biologische Wirkungsweise derartiger Materialien ist zudem nach wie vor unklar.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Knochenmaterial mit körpereigenen Eigenschaften herzustellen, das von seinen Ausmaßen her genügend groß ist, um auch größere Defekte überbrücken zu können.

Die Lösung dieser Aufgabe besteht im Prinzip darin, knochenbildende Zellen, wie z. B. Osteoblasten aus der Zellkultur, extrakorporal mit calciumphosphatischen Werkstoffen, die chemisch dem Knochenmaterial ähnlich sind, und/oder Substratmaterialien in Form von Biopolymeren zu kombinieren und auf diesen Materialien zu kultivieren. Dabei sollen die gewissermaßen als Matrix dienenden Werkstoffe und Substratmaterialien so beschaffen sein, daß sie günstige Lebensbedingungen für die extrakorporale Entwicklung von lebenden Knochenzellen bieten, so daß sich diese auch gut vermehren lassen.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß die Verwendung calciumphosphatischen Materials einer Zusammensetzung möglichst nahe dem Verhältnis $\text{CaO}:\text{P}_2\text{O}_5=3:1$ diese Anforderungen erfüllt. Diesem Verhältnis entsprechen die Verbindungen Tricalciumphosphat und Hydroxylapatit (vgl. Abb. 3). Hiermit wurde es möglich, auch eine kurzfristige Generierung von Knochenmaterial zu gewährleisten.

Eine besonders vorteilhafte Verfahrensmaßnahme besteht darin, die auf den CaP-Matrizen abgelagerten Zellkulturen in Zellgeneratoren (Abb. 1) ständig von Nährlösung umströmen zu lassen, um sie so optimal mit der Nährlösung zu versorgen sowie gleichzeitig lokale

Übersättigungszustände aus den lebenden Zellkulturen zu beseitigen.

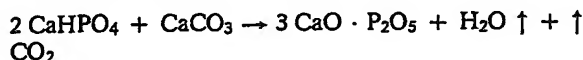
Das vorzugsweise poröse CaP-Matrixmaterial kann durch seine äußere Erscheinungsform, z. B. Granulate oder monolithische Formteile mit durchgehenden Poren (Abb. 2 b) optimal an unterschiedliche Indikationssituationen angepaßt werden.

Ähnlich positive Ergebnisse konnten mit Substratmaterialien in Form von Biopolymeren wie Kollagen Typ I erzielt werden. Kombiniert man die erfindungsgemäßen Biopolymere mit den erfindungsgemäßen CaP-Materialien, so läßt sich das Ergebnis des erfindungsgemäßen Verfahrens noch weiter verbessern.

Beispiele:

1. CaP-Matrix

Als eine besonders günstige Ausführungsart für die CaP-Matrizen wurde die Verbindung Tricalciumphosphat (β -Whitlockit) aus stöchiometrischen Mischungen aus CaHPO_4 und CaCO_3 durch Sintern über mehr als 8 h bei 1100°C gemäß der Formel



hergestellt, die entstandenen massiven Probematerialien wurden spanabhebend und mittels Bohren in durchgängig poröse Formstücke (Abb. 2 b) überführt.

Hierbei muß durch diese Wahl der Synthesbedingungen sichergestellt sein, daß die gemäß Abb. 3 mit Tricalciumphosphat ($3 \text{CaO} \times \text{P}_2\text{O}_5$) koexistierenden Phasen Dicalcium- und Tetracalciumphosphat möglichst nicht gebildet werden bzw. durch möglichst vollständigen Umsatz verschwinden, da diese letzteren Verbindungen zellschädigende pH-Werte entwickeln und dadurch die Entwicklung der Zellkulturen beeinträchtigen.

2. Kollagen-Matrix

Die Herstellung von Kollagen entsprechender Reinheit, d. h. ohne immunologisch bedenkliche Proteine, erfolgt nach einer besonders vorteilhaften Ausführungsart aus tierischen Knochen, vorzugsweise vom Kalb, aber auch vom Menschen. Hierzu werden Knochenstücke in 0,2 normaler HCl entkalkt, sodann wird das entkalkte Material mit Pepsin oder anderen Proteasen behandelt, welche die nicht-kollagenen Proteine "verdauen" und abbauen. Das verbleibende gelförmige Kollagen wird mit HCl oder Essigsäure gelöst und durch Zugabe von CaCl_2 -Lösung bei 4°C ausgefällt und von der Lösung getrennt (1. Reinigungsschritt). Zur weiteren Reinigung wird das Kollagen wiederum in HCl aufgelöst und durch erneute Zugabe von CaCl_2 -Lösung ausgefällt. Diese Reinigung wird insgesamt dreimal wiederholt, wobei ein hochreines, von Fremdproteinen freies Kollagen, Typ I gewonnen wird.

Die Viskosität und der Vernetzungsgrad dieses Kollagens, welches zur Herstellung der Züchtungsmatrix benutzt wird, kann durch die Ca^{2+} -Konzentration in weiten Grenzen eingestellt werden.

3. Anzucht der Zellkultur

Hinsichtlich der Anzucht menschlicher Osteoblastenzellen erwies sich folgender Weg als vorteilhaft: Die aus



dem Beckenkamm eines Menschen intra operationem entnommenen Knochenstückchen wurden mittels physiologischer Kochsalzlösung nach Dulbecco von Blut gereinigt und mit 5000 E/ml und 5000 µg/ml Penicillin-streptomycin zum Schutz gegen Infektionen behandelt. 5
Nach nochmaliger Reinigung werden die so behandelten Knochenproben in einer Nährlösung aus 10% fötalem Kälberserum ernährt (37°C, 5% CO₂, 20% O₂ und 100% relative Luftfeuchtigkeit). Die Nährlösung wurde alle 2 Tage gewechselt. Hierdurch wachsen die Zellkulturen und differenzieren sich zu Osteoblasten. 10

monolithischer, dem zu behandelnden Knochendefekt angepaßter Form vorliegen.

4. Vermehrung der Zellkultur und Bildung des "Verbundmaterials"

Die so angezüchteten Osteoblasten werden nach einer vorteilhaften Arbeitsweise mittels 0,03% Ethylendinitrotetraessigsäure-Lösung dispergiert und mit einer berechneten Konzentration von ca. 3600 Zellen/cm² Substrat in die poröse Calciumphosphat-Matrix eingeschwemmt. Nach einer zweistündigen Ruhezeit haben sich die Zellen auf der Keramik abgesetzt. Dann wird mit der Durchflutung der Zelle mit Nährlösung begonnen. Die chemische Zusammensetzung und insbesondere der PH, PCO₂, PO₂ werden in der austretenden Lösung laufend gemessen. Wenn sich die Lösung durch die Zellaktivität und durch partielle Anlösung der CaP-Matrize meßbar ändert, wird die einströmende Nährlösung entsprechend korrigiert. So ist gewährleistet, daß die Zellen stets optimale Lebensbedingungen behalten und die gesamte durchströmte Matrize oberflächlich mit einem dichten "Zellrasen" überziehen. Dies ist nach ca. 2 Wochen der Fall. 15 20 25 30

Patentansprüche

35

1. Verfahren zur Herstellung eines synthetischen Knochenmaterials mit körpereigenen Eigenschaften, dadurch gekennzeichnet, daß man menschliche Knochenzellen (Präosteoblasten und Osteoblasten) extrakorporal auf den dem natürlichen Knochenmineral ähnlichen calciumphosphatischen Werkstoffen, Substratmaterialien in Form von Biopolymeren oder Mischungen aus beiden züchtet. 40
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als calciumphosphatische Werkstoffe dem Verhältnis CaO:P₂O₅ = 3:1 möglichst eng entsprechende Calciumphosphate und als Biopolymere Kollagen verwendet. 45
3. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß man autologe Knochenzellen verwendet. 50
4. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß man einem fremden, aber immunologisch geeigneten Patienten entstammende Knochenzellen verwendet. 55
5. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man die auf den Matrizen abgelagerten Zellkulturen von der Nährlösung ständig umströmen läßt. 60
6. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrixmaterialien eine durchgängige poröse Form haben.
7. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrixmaterialien in granulärer Form vorliegen. 65
8. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die porösen Matrixmaterialien in



- Leerseite -

Nummer:
Int. Cl.
Anmeldetag:
Offenlegungstag:

38 10 803
A 61 L 27/00
30. März 1988
12. Oktober 1989

3810803

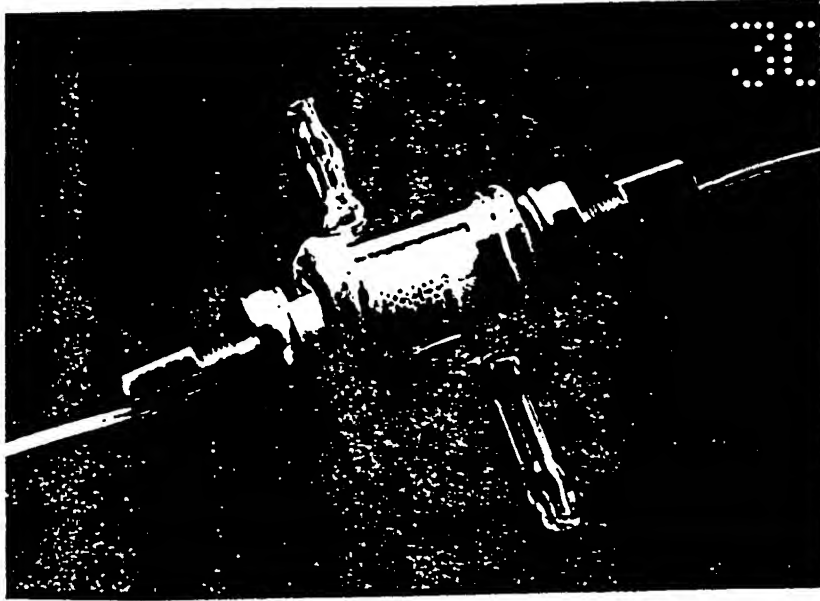


ABB. 1

8



ABB. 2 a

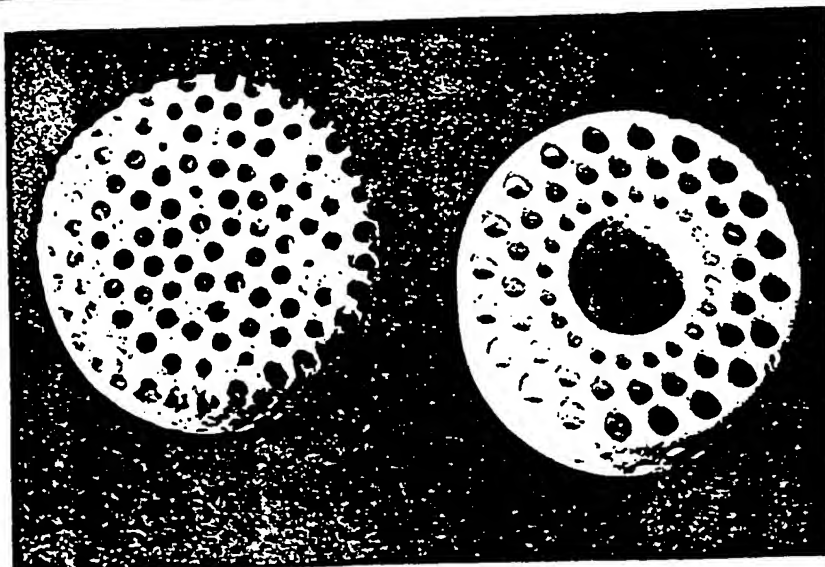


ABB. 2 b

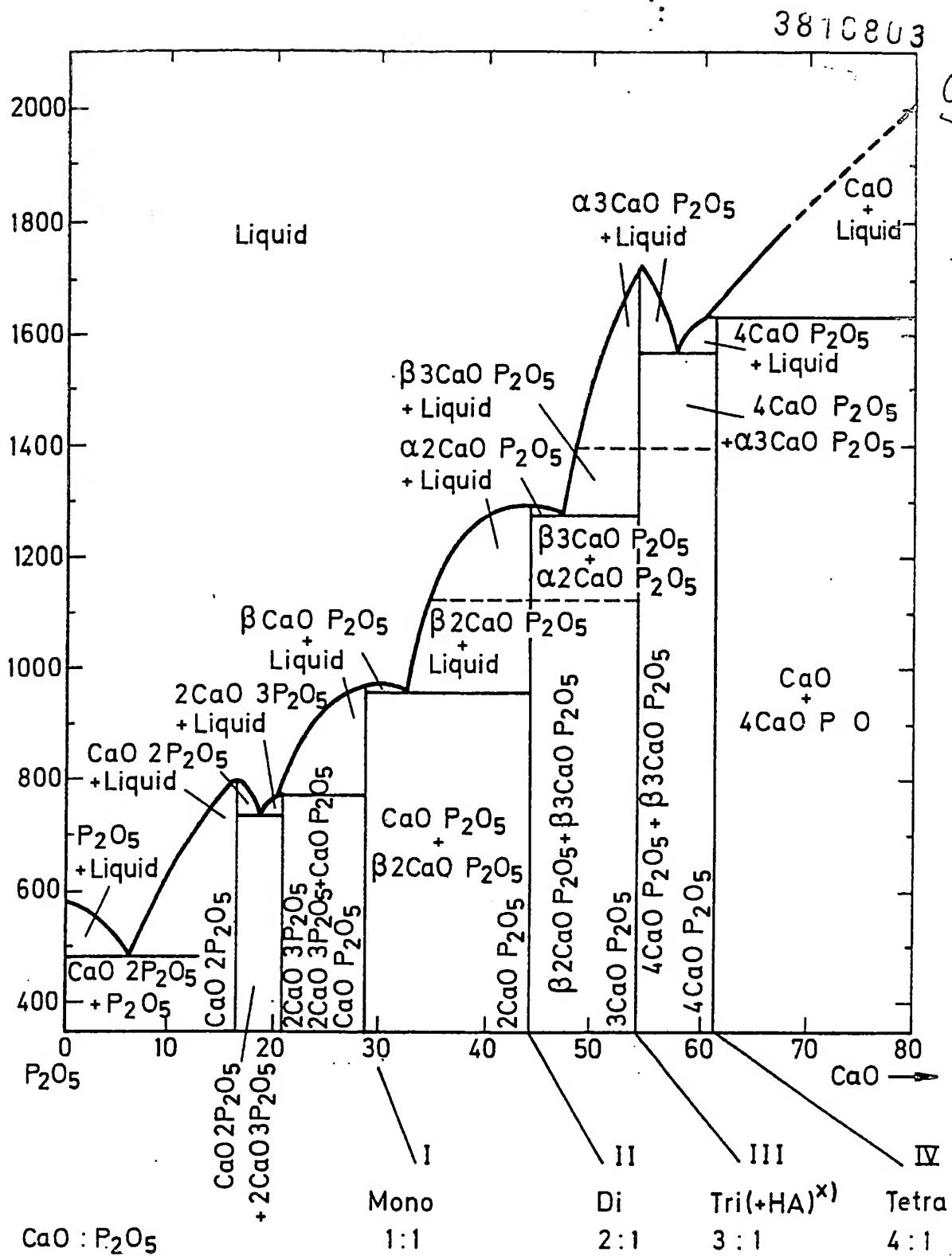


Fig.3



⑭ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Patentschrift
⑪ DE 38 10 803 C 2

⑤ Int. Cl. B:
A61 L 27/00
C 12 N 5/00

⑰ Aktenzeichen: P 38 10 803.8-45
⑱ Anmeldetag: 30. 3. 88
⑲ Offenlegungstag: 12. 10. 89
⑳ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 13. 6. 90

DE 38 10 803 C 2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦ Patentinhaber:
Battelle-Institut eV, 6000 Frankfurt, DE

⑧ Erfinder:
Heide, Helmut, Dr., 6233 Kalkheim, DE; Jones,
David, Dr., 4400 Münster, DE

⑨ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

US	44 85 096
EP	02 42 270
EP	00 49 341

④ Verfahren zur Herstellung eines synthetischen Knochenmaterials mit körpereigenen Eigenschaften

DE 38 10 803 C 2



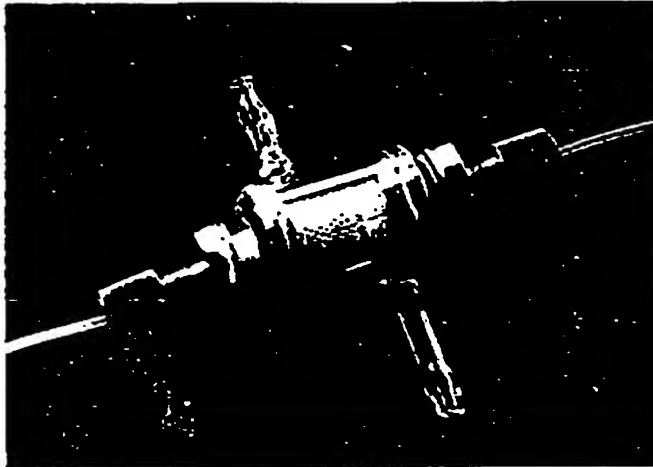
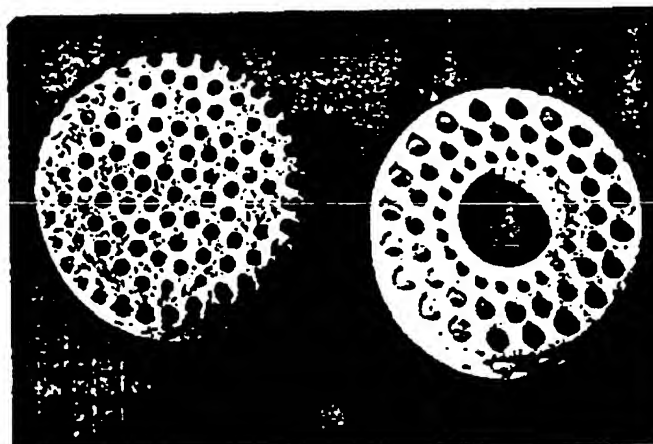


ABB: 1



ABB. 2 a



ABR. 2 b

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines synthetischen Knochenmaterials mit körpereigenen Eigenschaften.

In der orthopädischen Chirurgie besteht ein dringender Bedarf an Knochenersatz, mit dem auch größere Defekte überbrückt und geheilt werden können. Solcher Knochenersatz findet Einsatz z. B. bei folgenden Indikationen:

- in der Traumatologie bei ausgedehnten Trümmerbrüchen und großen Defekten;
- bei onkologischen Operationen zur endgültigen Stabilisierung und Ausfüllung des Defektes;
- bei schweren Wirbelsäulendormitosen werden in großem Umfang Knochen transplantiert;
- beim künstlichen Gelenkersatz;
- in der Kielerchirurgie u. a.

Da autologe Knochen (d. h. Knochen desselben Patienten) nur im begrenzten Maße zur Verfügung stehen, wurden bisher homologe Knochen aus der Knochenbank eingesetzt. Bei ständig steigendem Bedarf wird das Angebot an immunologisch geeignetem Material jedoch zunehmend geringer. Deshalb ist z. B. schon versucht worden, keramische Werkstoffe auf der Basis von Calciumphosphaten, denen eine gewisse osteo-induktive Wirkung zugesprochen wird, in die betreffenden defekten Stellen des Körpers einzusetzen. Derartige Möglichkeiten konnten aber die Aufgabe zur Therapie größerer Knochendefekte nicht erfüllen, weil nur kleinere Defekte überbrückt werden könnten. Die biologische Wirkungsweise derartiger Materialien ist zudem nach wie vor unklar.

Die EP-A2 49 341 beschreibt ein Verfahren zur Vorbereitung und Einpflanzung von alloplastischen Implantaten und Organimplantaten sowie zur Vorbehandlung des Empfängers, wobei auf die Oberfläche des alloplastischen Materials, die mit Zellgewebe oder Knochen des Empfängerorganismus in Kontakt kommen soll, ein Zellrasen von in Kultur gezüchteten, lebenden Gewebezellen nach den Methoden der Zellkultur aufgezüchtet wird. Als alloplastische Substratmaterialien werden Kunststoffe, Keramik, Biogläser und so fort eingesetzt. Als menschliche Knochenzellen kommen Osteoblasten zum Einsatz. Das Aufzüchten von autologen oder an den Empfänger adaptierten Zellen auf das Organtransplantat erfolgt extrakorporal.

Die US-A4 4 85 096 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung eines synthetischen Hautersatzmaterials bzw. eines Wundmaterials, das zur Herstellung von Prothesen geeignet ist. Dabei werden menschliche Knochenzellen homogen in einem Kollagenmaterial dispergiert.

Die EP-A1 2 42 270 beschreibt ein Verfahren zur Aufzucht von menschlichen Zellen (Fibroblasten) auf einem Kollagenblatt in einem geeigneten Kulturmedium. Die Kollagenblätter dienen dabei als künstliche Haut zur Behandlung von Verbrennungen.

Demgegenüber ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Knochenmaterial mit körpereigenen Eigenschaften herzustellen, das ggf. auch so groß ist, daß damit größere Defekte überbrückt werden können.

Die Lösung dieser Aufgabe besteht darin, daß man menschliche Knochenzellen extrakorporal auf einem porösen Substrat züchtet, das dabei ständig von einer Nährlösung umströmt wird.

Dadurch wird erreicht, daß praktisch das gesamte Volumen des porösen Substrats mit der Nährlösung umströmt wird, wodurch die Erfindungsaufgabe gelöst wird. Die Nährlösung kann ggf. in einem Kreislauf aufbereitet werden und wird dann dem porösen Substrat wieder zugeführt. Mit der erfindungsgemäßen Verfahrensführung wird also eine Lösung vorgeschlagen, mit der Knochenmaterial in einem wirtschaftlichen Verfahren hergestellt werden kann, ggf. auch in größeren Teilen, deren Geometrie dem jeweiligen Einsatzzweck angepaßt ist. Das nach dem Verfahren hergestellte Knochenmaterial wird anschließend dem Patienten reimplantiert, von dem zuvor die entsprechenden Knochenzellen entnommen worden sind.

Die auf dem porösen Substrat abgelagerten Zellkulturen werden ständig von der Nährlösung umströmt, wodurch sie optimal mit der Nährlösung versorgt werden, und zwar praktisch über das gesamte Volumen des porösen Substrats und es werden gleichzeitig lokale Übersättigungszustände aus den lebenden Zellkulturen beseitigt.

Das der Erfindung zugrundeliegende Prinzip besteht somit darin, knochenbildende Zellen, wie z. B. Osteoblasten aus der Zellkultur, extrakorporal mit calciumphosphatischen Werkstoffen, die chemische dem Knochenmaterial ähnlich sind, und/oder Substratmaterialien in Form von Biopolymeren zu kombinieren und auf diesen Materialien zu kultivieren. Dabei sollen die gewissermaßen als Matrix dienenden Wirkstoffe und Substratmaterialien so beschaffen sein, daß sie günstige Lebensbedingungen für die extrakorporale Entwicklung von lebenden Knochenzellen bieten, so daß sich diese auch gut vermehren lassen.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß die Verwendung calciumphosphatischen Materials einer Zusammensetzung möglichst nahe dem Verhältnis $\text{CaO} : \text{P}_2\text{O}_5 = 3 : 1$ diese Anforderungen erfüllt. Diesem Verhältnis entsprechen die Verbindungen Tricalciumphosphat und Hydroxylapatit (vgl. Abb. 3). Hiermit wurde es möglich, auch eine kurzfristige Generierung von Knochenmaterial zu gewährleisten.

Das poröse CaP-Matrixmaterial kann durch seine äußere Erscheinungsform, z. B. Granulate oder monolithische Formteile mit durchgehenden Poren (Abb. 2b) optimal an unterschiedliche Indikationssituationen angepaßt werden.

Ähnlich positive Ergebnisse konnten mit Substratmaterialien in Form von Biopolymeren, wie Kollagen Typ I, erzielt werden. Kombiniert man Biopolymere mit CaP-Materialien, so läßt sich das Ergebnis des erfindungsgemäßen Verfahrens noch weiter verbessern.

Beispiele

1. CaP-Matrix

Als eine besonders günstige Ausführungsart für die CaP-Matrizen wurde die Verbindung Tricalciumphosphat (β -Whitlockin) aus stöchiometrischen Mischungen aus CaHPO_4 und CaCO_3 durch Sintern über mehr als 8 h bei 1100°C gemäß der Formel



hergestellt, die entstandenen massiven Probematerialien wurden spanabhebend und mittels Bohren in durchgängig poröse Formstücke (Abb. 2b) überführt.

Hierbei muß durch diese Wahl der Synthesebedin-



gungen sichergestellt sein, daß die gemäß Abb. 3 mit Tricalciumphosphat ($3\text{CaO} \times \text{P}_2\text{O}_5$) koexistierenden Phasen Dicalcium- und Tetracalciumphosphat möglichst nicht gebildet werden bzw. durch möglichst vollständigen Umsatz verschwinden, da diese letzteren Verbindungen zellschädigende pH-Werte entwickeln und dadurch die Entwicklung der Zellkulturen beeinträchtigen.

2. Kollagen-Matrix

Die Herstellung von Kollagen entsprechender Reinheit, d. h. ohne immunologisch bedenkliche Proteine, erfolgt nach einer besonders vorteilhaften Ausführungsart aus tierischen Knochen, vorzugsweise vom Kalb, aber auch vom Menschen. Hierzu werden Knochenstücke in 0,2 normaler HCl entkalkt, sodann wird das entkalkte Material mit Pepsin oder anderen Proteasen behandelt, welche die nicht-kollagenen Proteine "verdauen" und abbauen. Das verbleibende gelartige Kollagen wird mit HCl oder Essigsäure gelöst und durch Zugabe von CaCl_2 -Lösung bei 4°C ausgefällt und von der Lösung getrennt (1. Reinigungsschritt). Zur weiteren Reinigung wird das Kollagen wiederum in HCl aufgelöst und durch erneute Zugabe von CaCl_2 -Lösung ausgefällt. Diese Reinigung wird insgesamt dreimal wiederholt, wobei ein hochreines, von Fremdproteinen freies Kollagen, Typ I gewonnen wird.

Die Viskosität und der Vernetzungsgrad dieses Kollagens, welches zur Herstellung der Züchtungsmatrix benutzt wird, kann durch die Ca^{2+} -Konzentration in weiten Grenzen eingestellt werden.

3. Anzucht der Zellkultur

Hinsichtlich der Anzucht menschlicher Osteoblastenzellen erwies sich folgender Weg als vorteilhaft: Die aus dem Beckenkamm eines Menschen intra operationem entnommenen Knochenstückchen wurden mittels physiologischer Kochsalzlösung nach Dulbecco von Blut gereinigt und mit 5000 E/ml und 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Penicillin-streptomycin zum Schutz gegen Infektionen behandelt. Nach nochmaliger Reinigung werden die so behandelten Knochenproben in einer Nährlösung aus 10% fötalem Kälberserum ernährt (37°C , 5% CO_2 , 20% O_2 und 100% relative Luftfeuchtigkeit). Die Nährlösung wurde alle 2 Tage gewechselt. Hierdurch wachsen die Zellkulturen und differenzieren sich zu Osteoblasten.

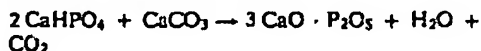
4. Vermehrung der Zellkultur und Bildung des "Verbundmaterials"

Die so angezüchteten Osteoblasten werden nach einer vorteilhaften Arbeitsweise mittels 0,03% Ethylendinitrotetraessigsäure-Lösung dispergiert und mit einer berechneten Konzentration von ca. 3600 Zellen/ cm^2 Substrat in die poröse Calciumphosphat-Matrix eingeschwemmt. Nach einer zweistündigen Ruhezeit haben sich die Zellen auf der Keramik abgesetzt. Dann wird mit der Durchflutung der Zelle mit Nährlösung begonnen. Die chemische Zusammensetzung und insbesondere der pH , PCO_2 , PO_2 werden in der austretenden Lösung laufend gemessen. Wenn sich die Lösung durch die Zellaktivität und durch partielle Anlösung der CaP-Matrize meßbar ändert, wird die einströmende Nährlösung entsprechend korrigiert. So ist gewährleistet, daß die Zellen stets optimale Lebensbedingungen behalten und die gesamte durchströmte Matrize oberflächlich mit einem

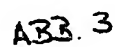
dichten "Zellrasen" überziehen. Dies ist nach ca. 2 Wochen der Fall.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines synthetischen Knochenmaterials mit körpereigenen Eigenschaften, dadurch gekennzeichnet, daß man menschliche Knochenzellen extrakorporal auf einem porösen Substrat züchtet, das dabei ständig von einer Nährlösung umströmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Substratmaterial einen dem natürlichen Knochenmaterial ähnlichen, calciumphosphatischen Werkstoff, ein Biopolymer oder eine Mischung aus beiden Werkstoffen verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als calciumphosphatischen Werkstoff $\text{CaO} : \text{P}_2\text{O}_5$ in einem Verhältnis von etwa 3 : 1 verwendet und als Biopolymer ein Kollagen.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man autologe Knochenzellen verwendet oder Knochenzellen von einem fremden aber immunologisch geeigneten Patienten.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Substrat verwendet, dessen Poren durchgehen.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Substrat in granulärer Form verwendet.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, daß man ein Substrat in monolithischer, dem zu behandelnden Knochendefekt angepaßter Form verwendet.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man als menschliche Knochenzellen Präosteoblasten und/oder Osteoblasten verwendet.
9. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der calciumphosphatische Werkstoff nach folgender Gleichung durch Sintern der Ausgangsmaterialien hergestellt wird, wobei die Sinterbedingungen so gewählt werden, daß Dicalciumphosphat und Tetracalciumphosphat möglichst nicht gebildet werden bzw. durch möglichst vollständigen Umsatz verschwinden:



Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen...



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.